



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(21) Numéro de publication:

0 298 807
A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 88401520.7

(22) Date de dépôt: 17.06.88

(51) Int. Cl.⁴: C 12 N 5/00

C 12 N 15/00, A 01 K 67/02,
C 12 P 21/02, A 61 K 37/64,
A 61 K 37/48

(30) Priorité: 19.06.87 FR 8708623

(43) Date de publication de la demande:
11.01.89 Bulletin 89/02

(64) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: TRANSGENE S.A.
16, rue Henri Régnault
F-92400 Courbevoie (FR)

(72) Inventeur: Skern, Tim
15, rue de St Dié
F-67100 Strasbourg (FR)

Courtney, Michael
11 rue des Lilas
F-67170 Geudertheim (FR)

Lecocq, Jean-Pierre
6, rue du champ du Feu
F-67116 Reichstett (FR)

(74) Mandataire: Warcoin, Jacques et al
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber
F-75116 Paris (FR)

(54) Procédé de préparation de lignées cellulaires stables pour la production de protéines déterminées, à partir d'animaux transgéniques; lignées cellulaires tumorales et protéines obtenues.

(57) L'invention concerne un procédé de préparation d'une lignée cellulaire stable pour la production d'une protéine déterminée, par l'induction de tumeurs dans des animaux transgéniques et la sélection des descendants ayant développé des tumeurs. Dans une variante, on introduit dans des animaux transgéniques la séquence codant pour la protéine, on sélectionne les descendants ayant intégré la séquence, et on fusionne les lymphocytes de la rate de ces animaux avec des cellules de myélomes. Dans les deux variantes, les lignées cellulaires dérivées des tumeurs produisent des protéines notamment d'intérêt thérapeutique.

EP 0 298 807 A1

La présente invention vise à fournir un nouveau procédé permettant la préparation d'une protéine déterminée, ce procédé utilisant la technique de création d'animaux transgéniques.

Plus précisément, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'une lignée cellulaire stable produisant une protéine déterminée, caractérisé en ce que :

- a) - on prépare un vecteur comportant
 - une séquence oncogène ainsi que les éléments assurant son expression dans une cellule eucaryote supérieure,
 - un bloc d'expression qui comprend au moins la séquence codant pour ladite protéine ainsi que les éléments assurant son expression dans une cellule eucaryote supérieure tumorale ;
- b) - on introduit ce vecteur dans un ou plusieurs œufs d'un animal et on réimplante le ou les œufs obtenus ;
- c) - on sélectionne les descendants ayant intégré l'oncogène et qui développent des tumeurs ;
- d) - on prélève et on cultive sur un milieu approprié les cellules tumorales ainsi obtenues et qui produisent la protéine déterminée afin d'obtenir une lignée cellulaire.

Sous un des aspects de l'invention, on peut, avant leur mise en culture, réimplanter les cellules tumorales plusieurs fois successivement dans d'autres animaux.

Dans une variante du procédé selon l'invention, on peut produire la protéine déterminée de la façon suivante :

- a) - on prépare un vecteur comportant
 - un bloc d'expression qui comprend au moins la séquence codant pour ladite protéine ainsi que les éléments assurant son expression dans une cellule eucaryote supérieure ;
 - b) - on introduit ce vecteur dans un ou plusieurs œufs d'un animal et on réimplante le ou les œufs obtenus ;
 - c) - on sélectionne les descendants ayant intégré la séquence codant pour ladite protéine ;
 - d) - on fusionne les lymphocytes de la rate de ces animaux avec des cellules de myelome et on sélectionne des clones d'hybridome produisant la protéine.

L'invention propose en particulier des moyens pour donner une spécificité tissulaire à l'expression de l'oncogène, de la protéine déterminée, ou des deux.

Il s'agit par exemple d'utiliser des signaux de contrôle puissants de l'expression dans les cellules lymphoïdes pour optimiser la production de protéines étrangères dans les transhybridomes.

L'induction spécifique de tumeurs dans les souris transgéniques peut être déclenchée par différents oncogènes et ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle de différents promoteurs pour influencer la spécificité tissulaire de la réponse.

On appellera "oncogène" dans la présente description le gène ayant la capacité d'induire chez l'animal une prolifération cellulaire du type de celle qui conduit à la formation de tumeur.

Parmi les oncogènes utilisables, il faut citer plus particulièrement les oncogènes d'origine virale quelles que soient leurs origines. Ainsi, il faut citer les oncogènes tels que c-myc, c-ras, c-fos ou l'antigène T de SV40, mais d'autres oncogènes peuvent être envisagés tels que les oncogènes src, erb, myb et onc par exemple.

De façon générale, le vecteur comportera à titre d'éléments d'expression tant de l'oncogène que de la séquence codant pour la protéine, un promoteur et également un activateur de transcription ("enhancer").

Par exemple, le promoteur et l'activateur de transcription ("enhancer") de la chaîne lourde des Ig peuvent être utilisés pour diriger l'expression vers les cellules lymphoïdes ; l'introduction de c-myc ou de l'antigène T de SV40 dans la même construction, induira le développement de lymphomes invasifs.

Selon le même principe, pour induire des tumeurs du foie on utilisera des promoteurs spécifiques des cellules hépatiques pour diriger l'expression de l'oncogène. On utilisera par exemple le promoteur de l'α-antitrypsine, du facteur VIII ou du facteur IX ou de l'albumine.

Théoriquement, on peut induire une tumeur de n'importe quel type de cellule pour autant que l'on associe le promoteur, le "enhancer" et l'oncogène appropriés.

Plus particulièrement, pour engendrer des tumeurs produisant une protéine étrangère, ce qui constitue l'objet de la présente invention, on placera le gène étranger sous le contrôle d'un promoteur efficace dans les cellules tumorales.

Ainsi dans le cas des cellules lymphoïdes on a constaté que les éléments régulateurs de l'immunoglobuline étaient particulièrement efficaces.

Plus particulièrement, dans le cas des cellules de lymphome induites par c-myc sous le contrôle du promoteur et du "enhancer" de la chaîne lourde des Ig, les gènes étrangers peuvent être placés sous le contrôle du promoteur de la chaîne légère des Ig, et également sous l'influence du même élément "enhancer" de la chaîne lourde. (On peut indifféremment inverser les 2 promoteurs et placer le gène étranger sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde et l'oncogène sous le promoteur de la chaîne légère).

Ce type de construction aboutit à une sécrétion efficace de la protéine étrangère par la cellule tumorale, aussi bien *in vivo* (dans ce cas la protéine se retrouve dans la circulation sanguine de la souris transgénique) et *in vitro* après mise en culture de lignées cellulaires dérivées des tumeurs.

De la même manière, dans le cas des cellules de tumeur du foie, les gènes étrangers peuvent être placés sous le contrôle de promoteurs puissants dans les cellules hépatiques, comme le promoteur de l'α-antitrypsine, de l'albumine, éventuellement additionnés de l'élément "enhancer" du virus de l'hépatite B (Babinet et al. 1985).

M13TG1930.

Figure 6 : Construction du plasmide pTG1990 permettant l'introduction du cADN de l' α_1 AT dans un plasmide portant les éléments de contrôle de transcription et traduction de l'immunoglobuline (abréviations : voir figure 3 - M = méthionine ; A = arginine).

Figure 7 : Introduction d'un site SmaI dans la région 3' non traduite du cADN de l' α_1 AT (mêmes abréviations que dans la figure 3).

Figure 8 : Construction du pTG1999 à partir des plasmides pTG1993 et pTG1990.

Figure 9 : Détail de la structure du pTG1999 à partir du "Start" de l'exon 2.

Figure 10 : Introduction du gène du grand antigène T du SV40 sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde d'Ig dans le pTG1999 (mêmes abréviations que dans la figure 3).

Figure 11 : Introduction du gène c-myc sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde Ig dans le pTG1999 (mêmes abréviations que dans la figure 3).

Méthodes

1) Manipulations de l'ADN

D'une manière générale, on utilisera les méthodes classiques, décrites dans "Molecular cloning. a laboratory manual" (1982) R. Maniatis, E.F. Fritsch et J.B. Sambrook, Cold Spring Harbor press.

a. Construction de nouvelles molécules d'ADN

a.1. Préparation des vecteurs et des fragments

Les enzymes de restriction sont utilisés conformément aux instructions du fournisseur (New England Biolabs et Promega Biotech).

On incube 1-2 μ g d'ADN dans 100 μ l avec la quantité d'enzyme nécessaire pour donner une digestion complète en 2 heures à 37°C. (La digestion est vérifiée par analyse électrophorétique en gel d'agarose)

Pour diminuer le bruit de fond et empêcher la religation des vecteurs, ils sont traités à la phosphatase alcaline bactérienne ou à la phosphatase intestinale de veau, ce qui élimine les extrémités 5' phosphates (on utilise 20 unités de phosphatase en tampon Tris 0,1 M pH 8,0, pendant 2 heures à 37°C). L'ADN est purifié par extraction au phénol-chloroforme puis précipité à l'éthanol et redissous en tampon Tris 10 mM pH7,5 EDTA 1 mM à une concentration d'environ 100 ng/ μ l.

Les vecteurs à bouts francs sont préparés par digestion à la nucléase S₁ de Aspergillus oryzae. On incube 5 μ g d'ADN, clivé par un enzyme de restriction, avec 10 unités de nucléase S₁ dans un volume de 100 μ l de solution de NaCl 0,3 M, CH₃COONa 0,03 M pH 4,8 et ZnCl₂ 0,003 M. La réaction est poursuivie à 37°C pendant 20 minutes puis elle est arrêtée par addition d'EDTA 10 mM. L'ADN est purifié comme décrit plus haut.

Les fragments d'ADN à insérer dans les vecteurs sont préparés de la manière suivante : 5 à 10 μ g d'ADN sont digérés par les enzymes de restriction appropriés et les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose puis le fragment choisi est récupéré à partir du gel (selon la méthode classique de Smith H.O. Methods in Enzymology (1980) 65, 371-380, ED. Grossman et Moldave).

Les fragments obtenus après mutagénèse dans les vecteurs M13 ne sont pas repurifiés avant insertion dans le vecteur puisqu'il n'y a pas de bruit de fond dû au M13 après sélection en ampicilline.

Les oligonucléotides synthétiques sont traités à la kinase avant d'être utilisés (on incube pendant 30 minutes à 37°C. 200 ng d'oligonucléotide 20 μ l de mélange réactionnel : Tris 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptopéthanol 10 mM, spermidine 0,1 mM, EDTA 0,1 mM et 10 unités de T₄ polynucléotide kinase).

Les oligonucléotides destinés à des mutagénèses dirigées sont récupérés à ce stade, par précipitation à l'éthanol en présence de 10 μ g de t-ARN porteur.

Les oligonucléotides servant de "linkers" ou d'adaptateurs sont traités de la manière suivante :

- quand les 2 brins ne sont pas identiques, ils sont soumis à la kination ensemble ; l'appariement des 2 brins (ainsi que l'appariement des brins complémentaires) se fait par chauffage à 65°C pendant 10 minutes suivi d'un refroidissement lent à 30°C puis à 4°C pendant au moins 4 heures.

a.2. Mutagénèse dirigée de fragments d'ADN

Les fragments d'ADN à muter sont insérés dans un des dérivés simple brin du phage M13 et sont appariés avec des oligonucléotides de synthèse portant la séquence voulue.

a.3. Ligation des fragments d'ADN

Les mélanges de ligation comprennent généralement 100 ng d'ADN du vecteur et 50 à 200 ng d'ADN du fragment à insérer ou 100 à 200 p.moles d'oligonucléotide, dans 20 μ l de tampon Tris 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, 2-mercaptopéthanol 6 mM et ATP 2 mM. L'incubation se fait à 14°C pendant 16 heures ou à température

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Pour maintenir l'oeuf en place lors de l'injection celui-ci est aspiré par une grosse aiguille aux bouts arrondis ; l'ADN est injecté avec une aiguille très fine qu'on pique dans un des noyaux : on poursuit l'injection jusqu'à ce qu'on voie la membrane de ce noyau (nucléoplasme) se dilater.

Les aiguilles sont actionnées à l'aide de micromanipulateurs installés de part et d'autre du microscope. Certains oeufs trop injectés éclatent. On les élimine et on ne garde que les oeufs correctement injectés pour la réimplantation.

d) Préparation des souris blanches "Swiss"

La veille de la manipulation, une quinzaine de souris "Swiss" sont mises avec des mâles vasectomisés, donc incapables de féconder les ovules de la femelle. Après une nuit avec le mâle il s'agit de repérer quelles femelles se sont accouplées avec les mâles. Pour ce faire il suffit de repérer à l'ouverture de l'utérus de la souris un bouchon translucide formé par le liquide spermatique du mâle. Chaque femelle ayant ce bouchon est donc considérée comme apte à commencer une gestation.

Sur une quinzaine de souris femelles, il y en a environ 1 à 5 qui seront sélectionnées pour la réimplantation.

e) Réimplantation des oeufs dans les souris porteuses

Après l'anesthésie d'une souris "Swiss" on fait une entaille dans la peau de celle-ci, au niveau où se trouve l'ovaire. Celui-ci une fois repéré est retiré hors du corps de la souris. On y repère la poche contenant les oeufs. On y fait une ouverture pour permettre l'introduction de la pipette capillaire dans laquelle on a aspiré les oeufs. On souffle le contenu de la pipette dans la poche et ainsi les oeufs fécondés et injectés sont prêts à partir pour le cycle de la gestation.

On remet ensuite l'ovaire en place et on referme les entailles faites sur la souris.

3) Production d'hybridomes

La fusion des cellules de rate et des cellules de myelome pour produire des hybridomes se fait selon la technique décrite par Köhler, G et Milstein, 1974, Nature 256, 495.

4) Mesure de l' α_1 -antitrypsine dans le plasma des souris par test ELISA

On utilise un test ELISA "en sandwich", très sensible (capable de détecteur 0.1 ng d' α_1 -AT) mis au point par Michalski et al. 1985, J. Immunol. Meth. 83, 101-112.

En résumé, un anticorps anti- α AT de chèvre est adsorbé sur les cupules des plaques d'immunodétection (Nunc-immunoplate).

Des dilutions en série d'une solution standard d' α -AT et des plasmas à analyser sont réalisées et mises en contact avec les cupules, pendant 1 heure à 37°C. Après rinçage, l' α -AT fixée est révélée par un deuxième anticorps, de lapin. Celui-ci va fixer un anticorps anti-lapin, marqué à la biotine, qui va fixer un complexe peroxydase-streptavidine (Amersham). Le complexe fixé sera révélé avec une solution de 0.1% O-phenylenediamine (Sigma)-1% méthanol-0.1% peroxyde d'hydrogène-H₂O. La réaction est arrêtée après 20 minutes par addition d'acide sulphurique 3 M. La réaction colorée est mesurée au spectrophotomètre Titertek-uniscan.

Les valeurs mesurées sont portées sur un graphique à double échelle logarithmique et la courbe établie avec la solution standard d' α -AT permet de calculer les concentrations de chaque échantillon.

Exemple 1

Expression d'une protéine étrangère dans des souris transgéniques, en utilisant des éléments régulateurs de transcription et de traduction des immunoglobulines.

A. Construction d'un vecteur d'expression pour l' α_1 -antitrypsine humaine (variant Arg³⁵⁸) : pTG1999

Le gène de l' α -antitrypsine humaine a été choisi comme premier modèle. La construction de départ est un plasmide qui porte la séquence codante du variant Arg³⁵⁸ de l' α -AT, pTG1951 (Ce plasmide ne se distingue du pTG152 (décris dans le brevet français 86.09608) que par un site de restriction ; tout autre plasmide portant le même bloc d'expression pourrait être utilisé).

La séquence codante de l' α -AT va être placée sous le contrôle des éléments régulateurs de l'immunoglobuline de souris provenant du gène réarrangé de la chaîne légère K, MPCII, décrit par Kelley et al. (1982) (voir figure 1).

La protéine de la chaîne légère est codée par 3 exons : l'exon 1 code pour la plus grande partie de la séquence signal (responsable de l'excration de la protéine hors des cellules), l'exon 2 code pour les 4 derniers acides aminés de la séquence signal et pour la région variable et l'exon 3 code pour la région constante. Le

10

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

B. Microinjection du pTG1999 dans les oeufs de souris

On sait que la présence de séquences du vecteur (pBR322, pUC8, pUC18) peut avoir un effet inhibiteur sur l'expression d'un transgène dans l'animal. Pour débarrasser la construction Ig- α AT du pTG1999 des séquences du vecteur, on digère le plasmide par Sall et Xmnl (figure 8). Le fragment recherché, de 4,0 kb, est séparé des 2 autres fragments (de 0,8 et 1,8 kb) par centrifugation en gradient de sucre. Le pool des fractions contenant le 4,0 kb est ensuite précipité à l'éthanol, redissous dans 200 μ l de tampon TE, extrait au phénol-chloroforme, reprécipité à l'éthanol et redissous dans 10 μ l de tampon TE. La solution d'ADN finale est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier l'absence de traces de fragments de vecteur contaminant.

Cette préparation d'ADN à 40 ng/ml est injectée dans les œufs fertilisés de souris. On injecte environ 500 copies par œuf. Au total, on a injecté 1014 œufs qui ont été réimplantés dans 72 souris femelles. On a obtenu 158 souriceaux.

On analyse l'ADN de chacun des souriceaux, sur une préparation d'ADN extrait à partir des queues des souriceaux, par hybridation avec une sonde radioactive dérivée du pTG1990 par "nick translation". Un seul souriceau donne un signal positif indiquant la présence du gène, il a été numéroté S.TG1999/1.

Une deuxième expérience a été réalisée dans les mêmes conditions ; on a injecté 706 œufs : ils ont été réimplantés dans 32 souris femelles ; on a obtenu 87 souriceaux vivants. Parmi ceux-ci, 7 ont intégré le transgène : S.TG1999/2 à 8.

La souris S.TG1999/1 est une femelle. Elle a été accouplée avec un mâle et on a étudié sa descendance pour vérifier si le transgène était stable d'une génération à l'autre. Parmi 19 souriceaux obtenus en 3 portées, 5 portaient le transgène. Il est donc plus probable que la souris S.TG1999/1 était une "mosaïque" plutôt qu'une souris homogène dont chaque cellule avait intégré le gène.

C. Mesure de l' α -antitrypsine dans le sang de la souris transgénique S.TG1999/1

La quantité d' α -antitrypsine présente dans le plasma de la souris transgénique a été déterminée par un test Elisa (décris dans le paragraphe Méthodes).

Les résultats sont présentés dans le tableau I.

On détecte une quantité significative d' α -AT : de 2 à 8 μ g/ml. Le modèle de mise du gène étranger sous la dépendance des éléments de contrôle de transcription et traduction des immunoglobulines est donc bien fonctionnel dans la souris.

D. Production d' α_1 -antitrypsine par des hybridomes dérivés de la souris S.TG1999/1

La souris S.TG1999/1 a été stimulée avec de l'adjuvant de Freund et sacrifiée une semaine plus tard. A ce moment on détectait 15 μ g/ml d' α -AT dans le sang.

Les lymphocytes de la rate ont été préparés et fusionnés avec les cellules de myélome P3.X63Ag8.653. 48 clones ont été obtenus et les surnageants des cultures analysées par Elisa.

Les 2 clones meilleurs producteurs, A2 et A5, produisent 3 ng/ml.

Après sous-clonage on a obtenu une production de 10-15 ng/ml après 5 jours de culture.

Exemple 2

Induction de tumeurs dans des souris transgéniques avec des vecteurs comportant le grand antigène T de SV40 et le bloc d'expression de l' α_1 -antitrypsine humaine.

A. Construction du vecteur

On récupère les éléments du SV40, la totalité du gène du grand antigène T et le signal de polyadénylation, à partir d'un plasmide qui a été construit pour exprimer la glycoprotéine de la rage, pTG173 (brevet français 83.15716) mais tout autre plasmide portant les mêmes séquences pourrait être utilisé.

Le plasmide pTG173 (figure 10) comprend, entre les nucléotides 2533 et 346, la totalité du grand antigène T de SV40 avec son signal de polyadénylation. Il peut être récupéré sous forme d'un fragment StuI-BamHI de 2,65 kb mais la coupure par StuI détruit la région promoteur précoce jusqu'à l'ATG initiateur.

Pour introduire un promoteur d'immunoglobuline en amont du gène T de SV40, on a digéré le plasmide pTG173 avec StuI, qui coupe le plasmide une deuxième fois dans le gène de la protéine rabique (figure 10).

Pour récupérer le promoteur de la chaîne lourde de l'immunoglobuline de souris, on utilise un plasmide pCLSpV, dérivé de pUC18 qui contient 2 polylinkers et un insert de 400 pb dérivé de l'hybridome NP-185-2 décrit par Bothwell et al. (1981).

Un fragment Smal-Smal est choisi pour être introduit dans le grand fragment StuI-StuI du pTG173 (figure 10), par ligation d'extrémités à bouts francs. Les transformants obtenus sont analysés pour déterminer l'orientation de l'insert Ig et un candidat est retenu : pTG2914.

Tableau I Détermination du taux d'α₁-AT dans le plasma des souris transgéniques portant le fragment SalI du pTG2917.

Souris	Age au moment de la mort	μg/ml d'α ₁ -AT dans le plasma		cause de la mort	remarques
		11.02.1987	2ème prise		
S.TG2917/1	13	0,32		défaillance cardiaque pendant prise de sang	descendance
S.TG2917/2	18	0,92	2,4 18.3.87	sacrifiée - nombreuses tumeurs lymphoides	
S.TG2917/3	11	0,8		occlusion intestinale causée par tumeurs des ganglions mésentériques	
S.TG2917/4	18	1	2 25.3.87	sacrifiée - nombreuses tumeurs	descendance
S.TG2917/5	13	0,72		sacrifiée - nombreuses tumeurs	
S.TG2917/6	vivante	0		-	soux transgénique (démontré plus tard)
S.TG2917/7	14	0,8	3,2 18.3.87	sacrifiée - nombreuses tumeurs lymphoides	tête arrondie ; difficultés motrices ; descendance
S.TG2917/8	10	2,43		sacrifiée - nombreuses tumeurs lymphoides	
S.TG2917/9	14	0,6	3,8 18.3.87	sacrifiée - nombreuses tumeurs lymphoides	tête arrondie ; difficultés motrices ; descendance

C. Pathologie des souris transgéniques et formation des tumeurs

Presque toutes les souris transgéniques de cette série sont plus petites que les souris normales de la même portée.

Les souris qui développent des tumeurs présentent en même temps un gonflement des ganglions lymphoides axiaux et brachiaux. Ces souris ont aussi des problèmes moteurs et finissent par ne plus bouger, tout en présentant des palpitations constantes.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Le moment du développement de la tumeur et de la mort de l'animal varie d'une souris à l'autre. A l'examen post-mortem, elles présentent toutes une hypertrophie des ganglions lymphoïdes, du thymus et de la rate, et parfois d'importantes tumeurs dérivées des ganglions mésentériques ou brachiaux.

L'examen histologique de ces tumeurs montre une importante infiltration par des cellules d'origine lymphoïde, B ou T.

3 souris (S.TG2926/1, 7 et 11) sont encore vivantes 18 semaines après leur naissance et ne semblent pas affectées par la présence du transgène.

D. Propagation des cellules tumorales in vivo

Les cellules sont récupérées à partir des tumeurs des ganglions brachiaux ou du thymus, comme décrit dans l'exemple précédent, et injectées par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale, à une dose de 10^5 - 10^7 cellules par souris (C57xSJL).

Toutes les souris injectées tombent malades dans les 2 semaines qui suivent l'injection, avec des symptômes semblables à ceux des souris transgéniques de première génération.

On mesure un taux d' α -AT de 1 à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans le plasma.

Les cellules tumorales peuvent être récupérées et réinjectées sur de nouvelles souris : celles-ci développent les mêmes tumeurs et produisent de 1 à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d' α -AT dans le plasma.

L'examen histologique des souris réinjectées montre que les tumeurs ont la même morphologie et la même localisation que dans les premières souris transgéniques. On constate que les tumeurs induites par le pTG2926 ont un caractère très agressif et invasif.

On a tenté d'obtenir des tumeurs d'ascites d'Ehrlich, par injection intrapéritonéale des cellules tumorales dans des souris préalablement traitées au pristan. Les souris n'ont pas développé de tumeurs d'ascites mais ont présenté une hypertrophie des ganglions lymphatiques, surtout mésentériques, et la formation de tumeurs. Cette expérience montre donc la nécessité, pour la multiplication de ces cellules transformées, d'un environnement physiologique typique de tissu lymphoïde.

E. Propagation des cellules tumorales in vitro

Les cellules tumorales ont été mises en culture, comme dans l'exemple 2. Le surnageant des cultures a été mesuré en test Elisa : on obtient de 50 à 600 ng d' α -AT/ml.

Il est donc possible d'obtenir des lignées cellulaires permanentes qui expriment et sécrètent l' α -AT.

Les conditions de culture et de production peuvent encore être optimisées.

F. Etude de la descendance des souris transgéniques S.TG2926

Quelques souris ont donné une descendance (voir tableau II) : la souris S.TG2926/6 a donné 15 souriceaux dont 8 portaient le transgène ; la S.TG2926/11 a donné 13 souriceaux dont 6 portaient le transgène.

La descendance des souris S.TG2926/1 et 7 ne portait pas le transgène.

Dépôt de souches représentatives de l'invention

Les souches suivantes ont été déposées à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (25 Rue du Dr. Roux, Paris), le 15 juin 1987 :

5K/pTG1999 sous le n° 1668

5K/pTG2917 sous le n° 1669

5K/pTG2926 sous le n° 1670.

REFERENCES

- 1) Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. Ann. Rev. Genetics 20, 465-499 (1986).
- 2) Swift, G.H., Hammer, R.E., Mac Donald, R.J. & Brinster, R.L. Cell 38, 639-646 (1984).
- 3) Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M. & Alexander, W.S. Nature 318, 533-538 (1985).
- 4) Quaife, C.J., Pinkert, C.A., Ornitz, P.M., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. Cell, 1023-1034 (1987).
- 5) Rüther, U., Garber, Ch., Komitowski, Müller, R. & Wagner, E. F. Nature 325, 412-416 (1987).
- 6) Palmiter, R.D., Chen, H.Y., Messing, A. & Brinster, R.L. Nature 316, 457-460 (1985).
- 7) Babinet, C., Morello, D., Rougeot, C. & Rouyre, S. Eur. J. Immunol. 16, 1033-1035 (1986).
- 8) Babinet, C., Farza, H., Morello, D., Hadchouel, M. & Pourcel, C. Science 230, 1160-1163 (1985).
- 9) Sifers, R.N., Carlson, J.A., Clift, S.M., Demayo, F.J., Ballock, D.W. & Woo, S.L.C. Nucl. Acids Res. 15, 1459-1475 (1987).
- 10) Overbeek, P.A., Chepelinsky, A., Khillan, J.S., Piatigorsky, J. & Westphal, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7815-7819 (1985).

l'oncogène et de la protéine dans les cellules hépatiques, les éléments assurant l'expression sont des éléments régulateurs de la synthèse d'une protéine hépatique ou d'un virus hépatique.

16) Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi les promoteurs de l'alpha-antitrypsine, de l'albumine et l'activateur de transcription est: celui du virus de l'hépatite B.

17) Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que l'animal est choisi parmi les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les poissons.

18) Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la protéine déterminée est une protéine d'intérêt thérapeutique choisie parmi les protéines humaines ou animales et les antigènes viraux ou d'autre origine.

19) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la protéine déterminée est: une protéine humaine d'origine hépatique et en ce que la lignée cellulaire obtenue est une lignée de tumeur hépatique.

20) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la protéine déterminée est choisie parmi: l'alpha-antitrypsine,
les facteurs de coagulation du sang,

leurs variants ou analogues ayant ou non sensiblement la même activité thérapeutique.

21) Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que la protéine déterminée est choisie parmi le facteur VIII et le facteur IX.

22) Animal transgénique obtenu par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 21.

23) Animal selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souris.

24) Cellule d'un animal transgénique selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisée en ce qu'elle exprime l'oncogène et la protéine déterminée.

25) Cellule selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule lymphoïde ou d'une cellule hépatique.

26) Tumeurs résultant de la transformation des cellules selon l'une des revendications 24 ou 25.

27) Lignées cellulaires pouvant être obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 21, ou dérivant des tumeurs selon la revendication 26.

28) Procédé de préparation d'une protéine déterminée à partir de cellules eucaryotes supérieures, caractérisé en ce qu'on utilise les lignées cellulaires selon la revendication 27 et on récupère la protéine obtenue.

29) Protéine obtenue par le procédé selon la revendication 28.

30) Protéine obtenue par le procédé selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit de l'alpha-antitrypsine ou d'un de ses variants.

31) Protéine obtenue par le procédé selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'il s'agit du facteur VIII ou du facteur IX de la coagulation sanguine ou d'une protéine ayant la même activité biologique.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

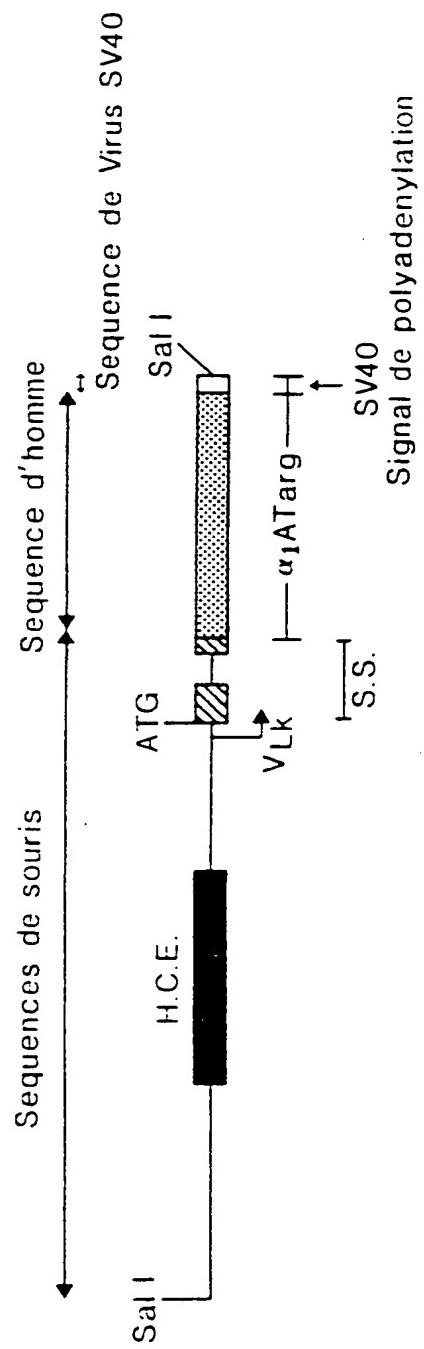
50

55

60

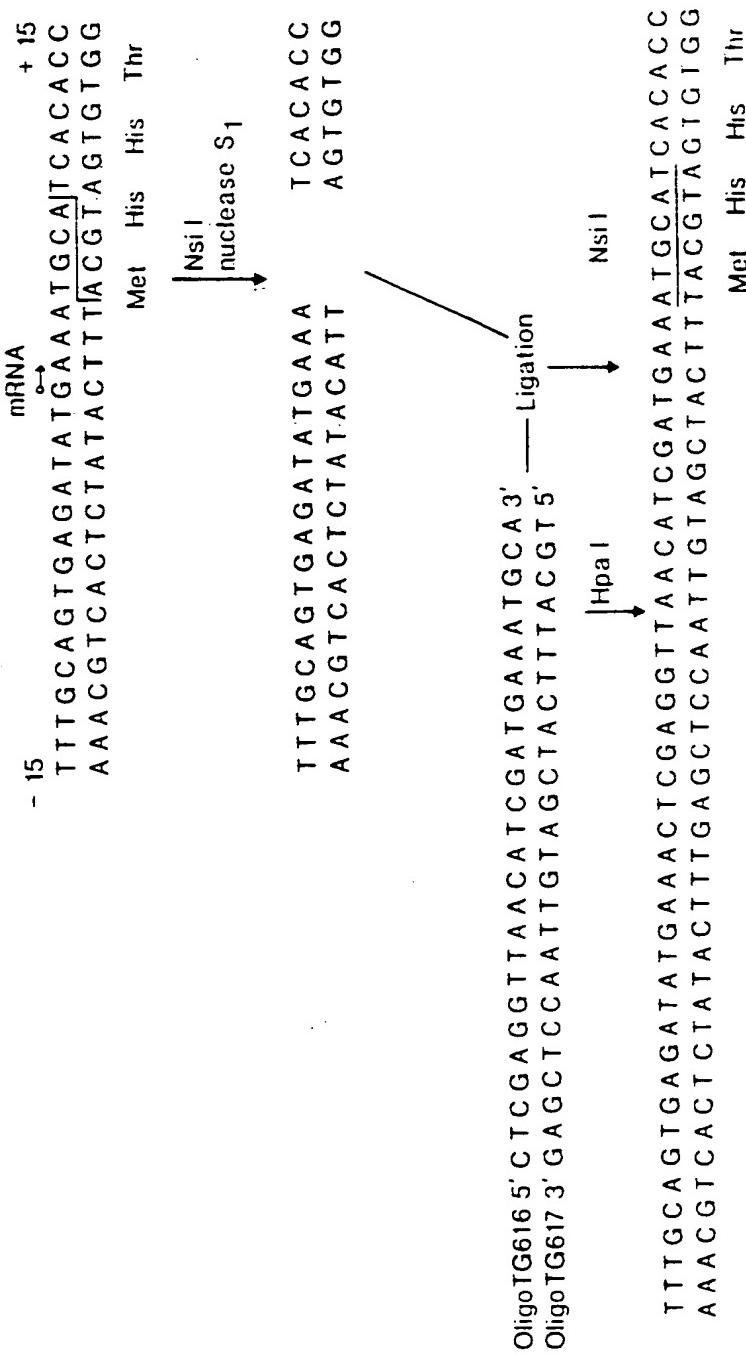
65

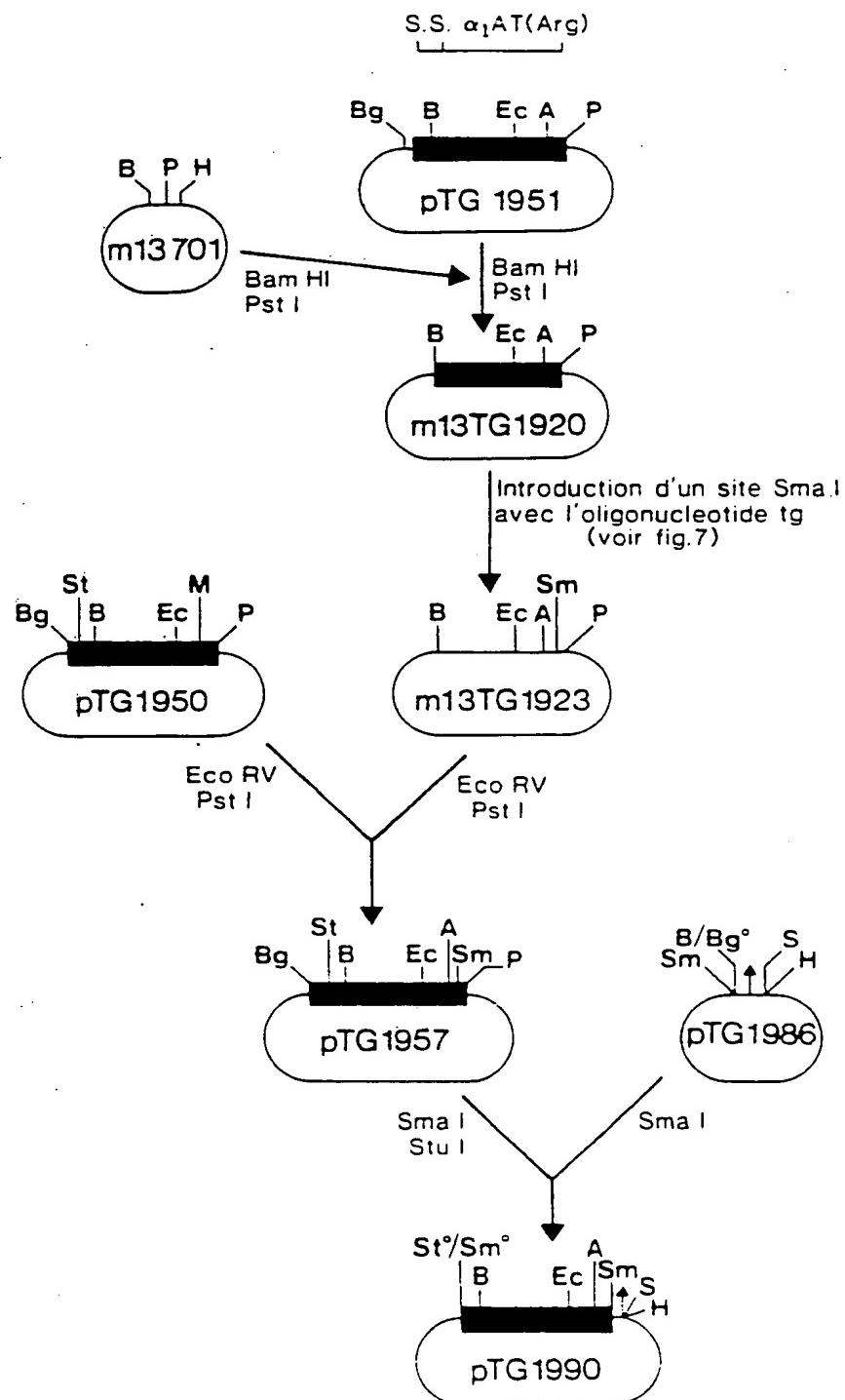
0298807



F|G-2

0298807



FIG-6

0298807

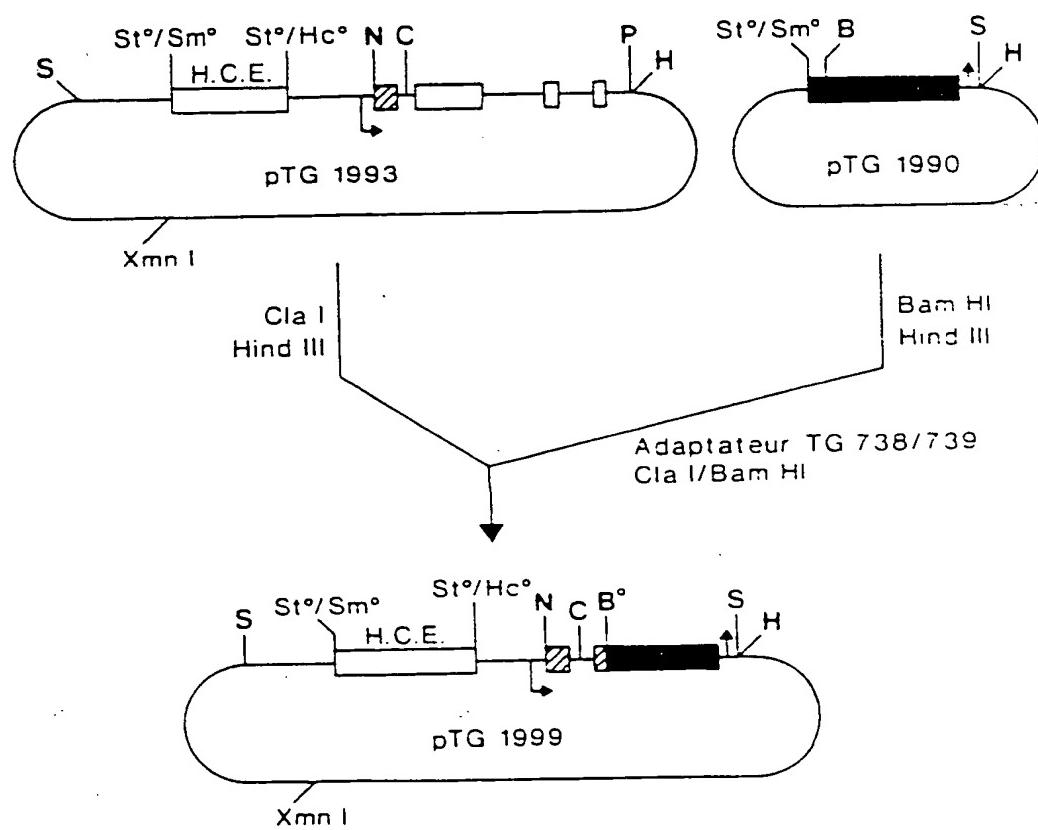
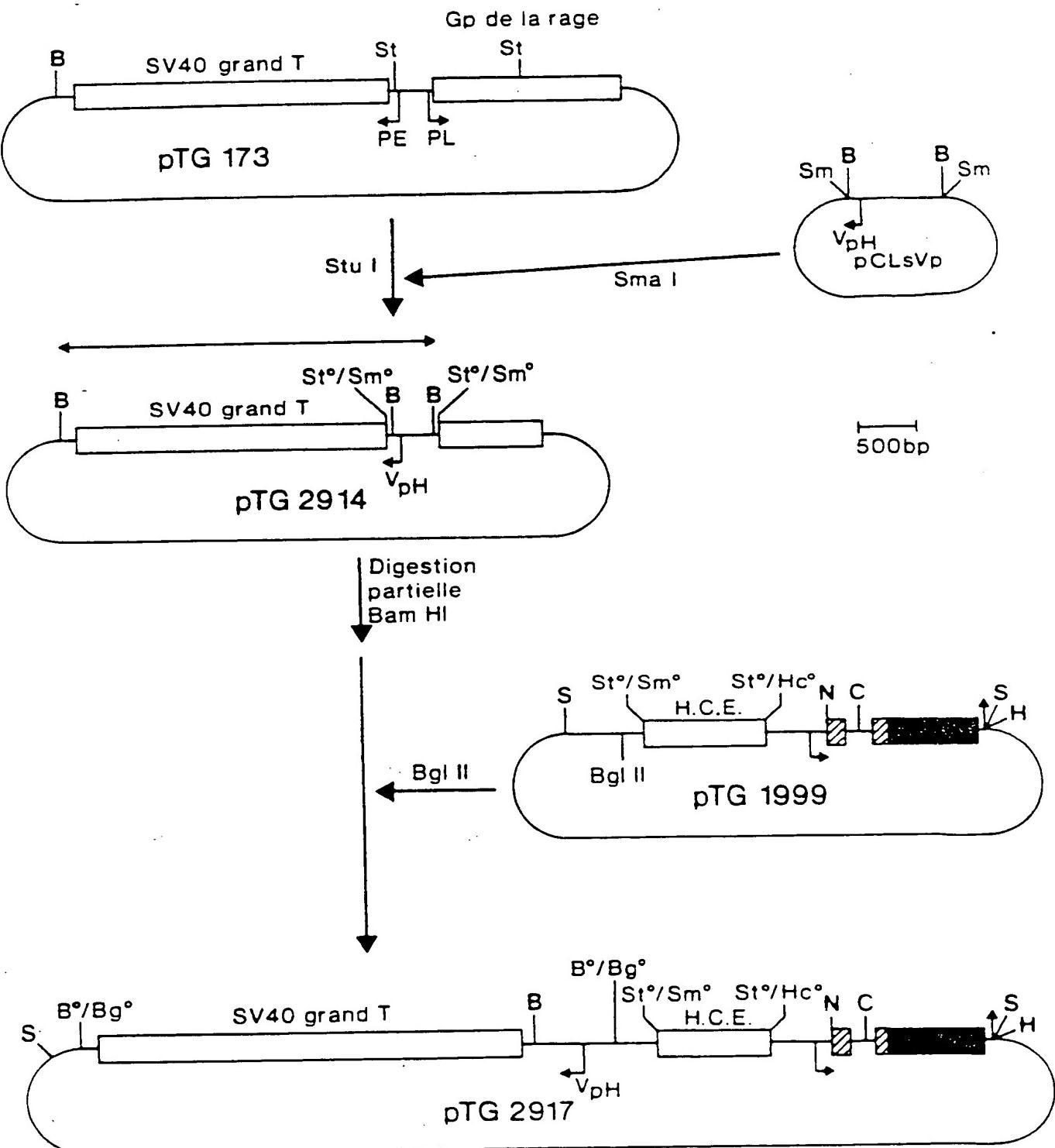


FIG-8

FIG-10



EP 88 40 1520

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	NATURE, vol. 315, 9 mai 1985, pages 115-122; D. HANAHAN: "Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes" * En entier *	1-7, 9, 10, 17, 18, 24, 27-29	C 12 N 5/00 C 12 N 15/00 A 01 K 67/02 C 12 P 21/02 A 61 K 37/64 A 61 K 37/48
Y	FR-A-2 487 851 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU K.K.) * En entier *	1-7, 9, 10, 17, 18, 24, 27-29	
A -	EP-A-0 169 672 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) * En entier *	24, 27- 29	
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 84, mars 1987, pages 1299-1303; A.-C. ANDRES et al.: "Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: Tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice" * En entier *	1-7, 9, 10, 17, 18, 22- 26	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) C 12 N
A,D	NATURE, vol. 318, 12 décembre 1985, pages 533-538; J.M. ADAMS et al.: "The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice" * En entier *	1-7, 9, 10, 17, 18, 22- 27	
	---	-/-	

Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications

Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
LA HAYE	29-09-1988	CUPIDO M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		